報 文

ゴード型チーズの表面処理に使用したナタマイシンと ソルビン酸の残留量及び防かび効果の比較

(平成 2 年 6 月 20 日受理)

柴 田 正 ^{*1}	辻 澄子 ^{*1}	伊藤誉志男 ^{*1}
宇田川俊一 ^{*2}	鈴木明子 ^{*2}	成田紀子 ^{*2}
風間朗弘 ^{*2}	浅居良輝 ^{*3}	佐藤孝義 ^{*3}
相良一彦 ^{*4}	本田恒男 ^{*5}	平城里香 ^{*5}
慶田雅洋 ^{*6}	岡本勝利 ^{*7}	望月悦生 ^{*8}
菅 沼 修 ^{*8}		

Comparison of Natamycin and Sorbate Residue Levels and Antifungal Activities on the Surface Treatment of Gouda-type Cheese

Tadashi SHIBATA^{*1}, Sumiko TSUJI^{*1}, Yoshio ITO^{*1}, Shun-ichi UDAGAWA^{*2}, Meiko SUZUKI^{*2},
Noriko NARITA^{*2}, Akihiro KAZAMA^{*2}, Yoshiteru ASAI^{*3}, Takayoshi SATO^{*3},
Kazuhiko SAGARA^{*4}, Tsuneo HONDA^{*5}, Rika HIRAKI^{*5}, Masahiro IWAIDA^{*6},
Katsutoshi OKAMOTO^{*7}, Etsuo MOCHIZUKI^{*8} and Osamu SUGANUMA^{*8}

(^{*1}National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch: 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka, Japan; ^{*2}National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, Japan; ^{*3}Snow Bland Milk Products Co., Ltd., Food Research Laboratory: 1-1-2, Minamidai, Kawagoe-shi, Saitama Japan; ^{*4}Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Cheese Research Laboratory: Kobuchizawa 6897, Kitakoma-gun, Yamanashi, Japan; ^{*5}Kyodo Milk Industry Co., Ltd., Research Laboratories: 1-4-18, Shin-machi, Hoya, Tokyo, Japan; ^{*6}Nestle Co., Ltd.: 2-4-5, Azabudai, Minato-ku, Tokyo Japan; ^{*7}Ministry of Agriculture, Forestry and Fishery, Kobe Agricultural and Forestry Products Inspection Institute, Osaka Branch: 4-1-67, Otemae, Chuo-ku, Osaka, Japan; ^{*8}The Japanese National Committee of International Dairy Federation: 1-14-19, Kudankita, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan)

In Japan, dehydroacetate and sorbate are authorized as additives to be used as anti-microbial agents for cheese.

On the other hand, application of natamycin for the surface treatment of cheese is allowed in approximately 30 countries. In this investigation, we compared the effectiveness of

^{*1} 国立衛生試験所大阪支所: 大阪市中央区法円坂 1-1-43

^{*2} 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^{*3} 雪印乳業(株)分析部: 埼玉県川越市南台 1-1-2

^{*4} 雪印乳業(株)チーズ研究所: 山梨県北巨摩郡小淵沢町 6897

^{*5} 協同乳業(株)応用研究所: 東京都保谷市新町 1-4-18

^{*6} ネッスル(株): 東京都港区麻布台 2-4-5

^{*7} 農林水産省神戸農林規格検査所大阪支所: 大阪市中央区法円坂 6-25

^{*8} (社)日本国際酪農連盟: 東京都千代田区九段北 1-14-19

natamycin and sorbate by treating Gouda-type cheese, specially manufactured for this purpose, with different concentrations of antimicrobials and with different methods of application. The results may be summarized as follows.

1. Natamycin remains on the surface of the cheese not penetrating inside, while sorbate was shown to penetrate inwards, diffusing throughout the cheese.
2. Natamycin showed low effectiveness at the concentration of $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ (when applied by the coating method), amounting to one-hundredth of that of sorbate.
3. So far as application mode was concerned, coating was more effective than the dipping method, showing the same effect on cheese at about one-fifth concentration compared with the dipping method.
4. When natamycin was applied by the coating method, it could be completely removed by scraping off 5 mm of the exterior.
5. The effectiveness of natamycin continued for as long as 8 weeks after application both by the coating and dipping methods, showing a selective effect on molds compared with sorbate. If cheese was not treated with either of the antimicrobials, molding began as early as at two weeks after manufacturing, becoming an obstacle to further ripening and storage of the cheese.

6. Most of the molds on the cheese were identified as strains belonging to genus *Penicillium*, *P. viridicatum* and *P. roquefortii* being the most frequently isolated strains.

(Received June 20, 1990)

Key words: ゴーダチーズ gouda-type cheese; 保存料 preservatives; ナタマイシン natamycin; ソルビン酸塩 sorbate; カビ molds; 抗菌剤 anti-microbial agent; *Penicillium* 属 *Penicillium*

ナタマイシンは1955年に南アフリカ共和国 Natal 県 Pietermaritzburg の土壌から分離された放線菌 *Streptomyces nataliensis* の生産するポリエンマクロライド系抗生物質で、 $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{NO}_{13}$ の分子式を有し、発見された地名をとってピマリシン (pimaricin) と呼ばれることもある¹⁾。本品は淡黄白色のほとんど無味、無臭の結晶性粉末である。その化学構造を Fig. 1 に示す。

本品は医療用としては、婦人科及び皮膚科領域でカンディダ症治療薬として用いられてきた²⁾が、最近その重要性は減少しつつある。これに対して食品の保存料としての需要は高まりつつある。特にナチュラルチーズ及びドライソーセージ (サラミなど) などの需要が有望視さ

れている。乳業の分野ではチーズの表面塗布剤として、味、外観などを変えることなく用いることができる。本品は EC 委員会により食品添加物 (E235) として承認されており、表面 1 dm^2 (100 cm^2) 当たり 2 mg までの範囲で使用が認められている³⁾。

しかしながら、我が国では、「食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示 370 号)」の冒頭に、「食品は抗生物質を含有してはならない」と規定されているので、チーズの製造に当たってナタマイシンを使用することは不可能な状態にあるのが現状である。

我が国では、チーズの保存料としてはソルビン酸及びデヒドロ酢酸のみ使用が認められている。しかしながら、ナタマイシンは前述の EC 加盟国を始め、アメリカ合衆国、東欧諸国、中近東諸国、南ア、南米など約 30 か国で既にチーズの表面処理剤として使用が許可されている。今回ゴーダ型チーズを対象として、製造に当たってナタマイシン及びソルビン酸を添加して使用した場合の使用法並びに使用量と残留性及び内部浸透性について比較し、併せて、チーズ熟成中に汚染菌として発生するカビに対する増殖抑制効果についても検討した結果について報告する。

実験方法

試料

ゴーダ型チーズ

A 社で常法⁴⁾に従って作製したベビータイプゴーダ型チーズ (450 g/個、直径 10 cm、厚さ 5 cm の扁平型) 約

Fig. 1. Structure of natamycin ($\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{NO}_{13}$)

100 個を使用した。

試 薬

ナタマイシン標準品: Gist Brocades 社製 Lot No. 714-EN-90-2 (純度 91.6%) を使用した。

ソルビン酸カリウム: 和光純薬工業(株)製試薬特級品を使用した。

ナタマイシン浸漬液: Gist Brocades 社製の Delvocide (ナタマイシン 50% 含有製剤) を 10% 食塩水に 0.2% の割合で懸濁し、調製した。

ソルビン酸カリウム浸漬液: ソルビン酸カリウムを 10% 食塩水の 0.2% の割合で溶かして 26.8% 溶液 (ソルビン酸として 20%) とした。

ナタマイシン塗布液: Delvosid を皮膜剤に溶かし、これを薄めてナタマイシンとして 0.05% 及び 0.0125% 溶液を調製した。

ソルビン酸カリウム塗布液: ソルビン酸カリウムを皮膜剤 (フロマコート溶液) に溶かし、ソルビン酸として 4% 及び 0.4% 濃度に調製した。

PDA 培地: 0.01% クロラムフェニコール添加ポテトデキストロース寒天培地 (PDA, 日水製薬(株)製)

GP 培地: ローズベンガル添加グルコース-ペプトン寒天培地 (GP)

YGC 培地: 酵母エキス-グルコース-クロラムフェニコール寒天培地 (YGC, メルク社製)

機 器

ストマッカー: J. Seward. UAC House. Model 6021.

高速液体クロマトグラフ (HPLC): 日本分光(株)製 880PU (検出器: 同 870UV) に TSK ゲル ODS-80TM (TOSOH) カラムを装着したものを使用した。

操作方法

1. 試料調製法

ナタマイシン及びソルビン酸カリウムの添加は浸漬法及び皮膜法 (酢酸ビニル樹脂膜による処理法) の 2 法を実施した。

(1) 浸漬法

ナタマイシン浸漬法: ナタマイシン浸漬液にチーズを 10 秒間浸漬した後風乾した。ただしナタマイシンは水に不溶性であるので、スターラーでかくはんしながらチーズを浸漬した。

ソルビン酸カリウム浸漬法: ソルビン酸カリウム浸漬液にチーズを 10 秒間浸漬した後、風乾してソルビン酸浸漬試料とした。

対照試料はチーズを 10% 食塩水に 10 秒間浸漬した後、風乾して調製した。

(2) 皮膜塗布法

ナタマイシン塗布法: ナタマイシン塗布液をチーズ表面に刷毛でコーティングした後、風乾して試料とした。

ソルビン酸カリウム塗布法: 各濃度のソルビン酸カリウム塗布液をそれぞれ刷毛でコーティングした後、風乾して試料とした。

対照試料は皮膜剤 (フロマコート溶液) をチーズ表面に刷毛でコーティングした後、風乾した。

2. 試料の貯蔵条件

A 社のチーズ熟成室及び B 社の保蔵庫の 2 か所の貯蔵条件は、通常の熟成条件である 11°, 相対湿度 90 ± 5% に調整し、また貯蔵期間を 0, 1, 2, 4, 8 及び 13 週間とした。

3. 検査用検体の調製

チーズを上からみて円形の中心を切るように 4 等分

Sample (5 g)

- put 5 g sample into polyethylene bag
- add 50 ml acetonitrile-0.02 M phosphate buffer, pH 6.8 (28:72)
- homogenize for 10 min by stomacher

Homogenate

- transfer the extract into a 100 ml brown measuring flask
- add 40 ml acetonitrile-0.02 M phosphete buffer, pH 6.8 (28:72)
- homogenize for 10 min by stomacher

Homogenate

- transfer the extract into the 100 ml brown measuring flask and make up to 100 ml with acetonitrile-0.02 M phosphate buffer, pH 6.8 (28:72)
- filter through membrane filter (0.45 µm)

Filtrate

HPLC analysis

Scheme 1. Analytical procedure for natamycin in natural cheese

Scheme 2. Analytical procedure for sorbic acid in natural cheese

し、そのうち1個を微生物検査用に、他の3個をナタマイシン及びソルビン酸の測定用として使用した。各試料は4機関に冷凍送付した。

4. 試験検査項目及び試験方法

1) 水分、pH及び酸度測定：各貯蔵期間における水分、pH及び酸度を測定した。また肉眼によるカビの発生状況を観察し、発生程度を5段階(0~4)に分けて評価した。

2) ナタマイシン残留量の測定：皮膜塗布試料についてはチーズのフィルムをはがし、また浸漬試料ではそのままの状態、表面から厚さ5 mmまでの試料及び中心部の試料について、ナタマイシンの残存量を丸山ら⁵⁾の方法により測定した。測定方法の概略をScheme 1に示す。

3) ソルビン酸の残留量の測定：試料5 gに1%トリクロ酢酸1 ml、0.05 Mリン酸緩衝液 pH 6.8-メタノール(1:1) 70 mlを加え、3分間ホモジナイズした。浸出液を100 mlの定容フラスコに移し、ホモジナイザーカップ及びカッターを少量の混液で洗浄し、100 mlの定容とした。定性ろ紙にてろ過し、ろ液10 mlをあらかじめ混液にて洗浄したSep-pak C₁₈ カラムに注入した。測定法の概略はScheme 2に示すとおりである。なおHPLCの条件はIDF Standard 139 (1987)に従い、ODSカラムを用い、移動相に0.1 Mリン酸緩衝液-pH 6.8メタノール(9:1)、検出にはUV (230 nm)を用いて測定した。

4) チーズ試料の微生物検査

試料の表面部分10 gをとり、滅菌生理食塩水90 mlを加えて、滅菌ポリエチレンバッグに移し、ストマッカー中で2分間混合した。試料を10倍段階希釈し、各々

の希釈試料液0.5 mlずつをPDA培地の平板上に塗抹した。これを24°で5~7日間培養した後、出現したカビ及び酵母のコロニー数を計測した。また、代表的なカビのコロニーを分離し、形態学的観察を行い、同定した。

5) チーズの処理及び貯蔵環境中の微生物検査

チーズへの皮膜剤塗布室、熟成のための発酵室内の空中浮遊菌について、エアースンプラーを用いてGP培地及びYGC培地上に集菌、測定すると同時にPDA培地平板を用いて落下菌を試験した。又チーズ浸漬液についてもPDA培地を用いてカビの有無を検査した。

実験結果

1. チーズの水分、pH、酸度の経時的変化

貯蔵中のチーズの状態変化を把握するために0, 1, 2, 4, 8及び13週間後に各チーズの水分、pH、酸度を測定した。結果はTable 1に示すとおりである。

各検体とも熟成8週間から13週間にかけてpHの上昇が認められたのみで、特に対照と処理区との間に差は認められなかった。

2. ナタマイシン及びソルビン酸カリウムの経時的残留性及び浸透性について

各熟成期間ごとに表面から5 mmまでの厚さの試料と中心部の2検体について、3機関において残留量を測定した。結果はTable 2に示すとおりである。

浸漬法ではソルビン酸として20%及びナタマイシン0.2%の2試料について分析した。なお対照については表面、中心部共にナタマイシン及びソルビン酸は検出されなかったため、結果の記載を省略した。

皮膜法ではソルビン酸として4%及び0.4%、ナタマイシンとして0.05%及び0.0125%の4試料について分析した。ソルビン酸及びナタマイシンの3機関の測定

Table 1. Water Contents, pH and Acid Value of Cheese in the Preservation

Mode of addition	Concentration of natamycin and sorbic acid	Storage period (week)											
		0			1			2			4		
		H ₂ O (%)	pH	Acid value*	H ₂ O (%)	pH	Acid value*	H ₂ O (%)	pH	Acid value*	H ₂ O (%)	pH	Acid value*
Dipping	0.2% Natamycin				32.28	5.26	0.79	31.77	5.13	0.72	32.18	5.28	0.79
											33.20	5.31	0.86
											33.84	5.80	0.72
	20% Sorbic acid				32.03	5.27	0.83	31.56	5.30	0.83	31.79	5.30	0.76
											32.23	5.40	1.01
											32.29	5.45	0.83
Control		34.78	5.18	0.86	31.38	5.22	0.79	31.33	5.28	0.65	32.86	5.24	0.76
											33.07	5.60	0.68
											33.22	6.12	0.79
Coating	0.05% Natamycin				32.54	5.25	0.72	30.64	5.29	0.86	31.90	5.30	0.76
											32.43	5.40	0.86
											32.39	5.47	0.97
	0.0125% Natamycin				31.97	5.29	0.76	30.69	5.29	0.79	31.18	5.28	0.79
											31.47	5.40	0.86
											33.00	5.57	1.08
	4% Sorbic acid				32.17	5.30	0.79	30.69	5.29	0.86	31.88	5.30	0.83
											32.35	5.41	0.94
											32.77	5.72	0.79
	0.4% Sorbic acid				32.01	5.22	0.65	31.33	5.27	0.79	32.59	5.32	0.79
											32.50	5.44	0.90
											32.57	5.76	0.65
Control		34.78	5.18	0.86	31.87	5.26	0.68	30.77	5.23	0.79	32.19	5.30	0.76
											30.54	5.41	0.86
											32.97	5.57	0.86

* Acid value: ml NaOH/100 ml

Table 2. The Change in Natamycin and Sorbic Acid Contents in Gouda-type Cheese as the Time Proceeds ($\mu\text{g/g}$)

Mode of additive	Concentration of sorbate and natamycin	Storage period (week) and location (A, B)												
		0		1		2		4		8		13		
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
Dipping	20% Sorbic acid	Surface	A	4,380	3,350	3,995	2,527	2,742	2,567	2,394	2,216	1,897	1,829	1,299
			B	5,590	4,880	2,860	2,790	2,710	3,200	3,350	2,270	2,310	1,690	1,690
			C	3,264	3,030	2,654	2,483	2,776	2,923	2,540	1,987	2,286	1,882	1,795
		Average	4,411	3,753	3,110	2,600	2,733	2,863	2,761	2,157	2,164	1,800	1,595	
	Center		A	2.1	15.1	2.2	14.7	4.4	104	102	432	301	753	620
			B	nd	nd	nd	nd	3	16	11	170	150	510	430
			C	nd	nd	nd	nd	nd	23	37	171	212	445	445
		Average	nd	nd	nd	nd	3	47	50	257	221	568	498	
	0.2% Natamycin	Surface	A	39.1	30.9	19.3	3.7	0.4	2.1	4.1	19.4	3.9	9.4	12.2
			B	9.3	33.0	9.2	9.7	8.1	10.7	17.2	16.6	8.1	6.8	5.3
			C	8.5	28.6	6.4	3.6	3.6	8.6	7.8	8.4	11.7	5.9	1.0
		Average	19.3	30.7	11.8	5.7	4.0	7.0	9.7	14.8	7.9	7.4	6.2	
Center		A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
		B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
		C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	Average	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Coating	4% Sorbic acid	Surface	A	782	838	737	792	729	720	720	360	495	110	510
			B	700	770	780	940	900	730	850	460	600	81	520
			C	701	718	710	471	602	691	681	269	610	169	473
		Average	728	775	746	734	744	714	750	363	568	120	501	
	Center		A	2.9	1.5	nd	4.5	9.9	28.4	35.1	125	130	162	126
			B	nd	nd	nd	5	4	6	6	56	54	100	110
			C	nd	nd	nd	nd	nd	7	9	71	60	145	107
		Average	nd	nd	nd	3	5	12	17	84	81	136	114	

Table 2 continued

Mode of additive	Concentration of sorbate and natamycin	Storage period (week) and location (A, B)											
		0		1		2		4		8		13	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.4% Sorbic acid	Surface	A	253	160	181	123	199	134	122	36	116	23.6	108
	B	200	210	160	160	170	190	80	190	22	120	13	100
	C	223	217	261	261	115	145	76	123	38	134	22	84
	Average	235	196	201	201	140	178	97	148	32	123	20	93
	Center	A	nd	nd	nd	3.4	4.3	3.4	4.8	21.8	26.1	29.5	25.4
0.05% Natamycin	B	nd	nd	nd	nd	1	1	1	1	9	9	35	23
	C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6	3	13	12	36	25
	Average	nd	nd	nd	nd	1	2	3	3	14	16	34	24
	Surface	A	1.2	1.6	3.2	1.8	0.5	0.6	4.8	3.6	4.7	9.7	8.7
	B	2.1	1.4	4.3	4.3	1.3	3.6	3.8	3.6	7.4	6.3	5.5	7.4
0.0125% Natamycin	C	2.5	3.6	3.2	3.2	3.2	2.9	1.1	1.1	4.3	2.7	4.2	0.7
	Average	1.9	2.2	3.7	3.7	2.1	2.3	1.8	3.2	5.1	4.6	6.5	5.6
	Center	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
0.0125% Natamycin	Average	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Surface	A	1.2	1.3	1.3	0.3	0.3	0.6	nd	0.8	0.2	0.6	0.6
	B	0.7	0.8	1.1	1.1	0.6	0.4	1.1	0.4	1.7	nd	1.0	nd
	C	0.9	0.9	1.1	1.1	0.4	0.5	0.4	0.2	0.5	0.3	0.5	0.2
	Average	0.9	1.0	1.2	1.2	0.4	0.4	0.7	nd	1.0	nd	0.7	nd
	Center	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Average	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Note: nd < 0.2; Natamycin; nd < 1.0; Sorbic acid

値は極めて良く一致した。

次にナタマイシン及びソルビン酸塩の経時的浸透性について更に詳細に検討するためにナタマイシンの 0.2% 浸漬及びソルビン酸として 20% 浸漬処理の 2 試料について各熟成期間ごとに表面から 5 mm, 5~10 mm 及び

Fig. 2. Permeation of natamycin and sorbate into cheese

Sorbate: ○—○ Surface (0~5 mm); ●—● 5~10 mm; ⊙—⊙ center
Natamycin: ◇—◇ surface (0~5 mm); ◆—◆ 5~10 mm; △—△ center

中心部を取り、ソルビン酸及びナタマイシン含量を定量した結果を Fig. 2 に示した。

3. 貯蔵中における微生物の経時的発生状況

各期間中のカビの発生程度を肉眼的に 5 段階評価し、Table 3 に示した。

また写真は Fig. 3 の通りである。

浸漬法、皮膜法ともに無処理のコントロールは 1 部の試料で 2 週間後カビの発生が認められ、4 週間後は完全に全面がカビによって覆われた。これに対してソルビン酸塩 20% 浸漬処理した試料では、13 週間後も全くカビの発生は認められなかった。これについて成績のよい区はナタマイシン 0.05% 皮膜処理区で 13 週間後もカビの発生は中程度以下にとどまった。これに対してナタマイシン 0.2% 浸漬処理した試料はナタマイシン 0.0125% 皮膜処理した試料よりもやや成績が劣り、8 週間後にはかなりのカビの発生を認めている。

ナタマイシン及びソルビン酸塩処理したチーズの貯蔵中における真菌数の推移を測定した結果は、Table 4 及び Table 5 に示すとおりである。

カビを用いないチーズにおいては熟成工程におけるチーズ表面での微生物叢の重要な構成菌は酵母である。

今回の場合も熟成初期、すなわち 1 週間目の菌数は処理区、無処理区共すべて酵母であった。そして、その後カビが発生した場合においても真菌の真菌数は全体に経時的に増加の傾向が認められた。しかしソルビン酸として 20% 浸漬処理区のみは 2 週間後あるいは 8 週間後に

Table 3. Inhibitory Effect of Natamycin and Sorbic Acid on Mold Growth in Gouda-type Cheese during Storage in Ripening Period

Mode of addition	Concentration	Storage location	Storage period (week)					
			1	2	3	4	8	13
Dipping	20% Sorbic acid	A	0	0	0	0	0	0
		B	0	0	0	0	0	0
	0.2% Natamycin	A	0	1	3	3	3	3
		B	0	0	1	1	3	3
	Control	A	0	4	4	4	4	4
		B	0	1	4	4	4	4
Coating	4% Sorbic acid	A	0	0	0	1	3	3
		B	0	0	0	1	2	2
	0.4% Sorbic acid	A	0	2	2	3	4	4
		B	0	0	0	1	4	4
	0.05% Natamycin	A	0	0	0	1	2	2
		B	0	0	0	0	1	1
	0.0125% Natamycin	A	0	1	1	2	3	3
		B	0	0	0	1	2	3
	Control	A	0	3	3	4	4	4
		B	0	1	4	4	4	4

Rate of contamination: 4=very high; 3=high; 2=moderate; 1=low; 0=non-detected

Fig. 3-1.

Fig. 3-2.

Fig. 3-3.

Fig. 3-4.

Fig. 3-5.

Fig. 3-1. Picture of Gouda-type cheese after storage period of 1 week

①: dipping, control; ②: dipping, 20% sorbic acid; ③: dipping, 0.2% natamycin; ④: coating, control; ⑤: coating, 4% sorbic acid; ⑥: coating, 0.4% sorbic acid; ⑦: coating, 0.05% natamycin; ⑧: coating, 0.0125% natamycin

Fig. 3-2. Picture of Gouda-type cheese after storage period of 2 weeks

①: dipping, control; ②: dipping, 20% sorbic acid; ③: dipping, 0.2% natamycin; ④: coating, control; ⑤: coating, 4% sorbic acid; ⑥: coating, 0.4% sorbic acid; ⑦: coating, 0.05% natamycin; ⑧: coating, 0.0125% natamycin

Fig. 3-3. Picture of Gouda-type cheese after storage period of 4 weeks

①: dipping, control; ②: dipping, 20% sorbic acid; ③: dipping, 0.2% natamycin; ④: coating, control; ⑤: coating, 4% sorbic acid; ⑥: coating, 0.4% sorbic acid; ⑦: coating, 0.05% natamycin; ⑧: coating, 0.0125% natamycin

Fig. 3-4. Picture of Gouda-type cheese after storage period of 8 weeks

①: dipping, control; ②: dipping, 20% sorbic acid; ③: dipping, 0.2% natamycin; ④: coating, control; ⑤: coating, 4% sorbic acid; ⑥: coating, 0.4% sorbic acid; ⑦: coating, 0.05% natamycin; ⑧: coating, 0.0125% natamycin

Fig. 3-5. Picture of Gouda-type cheese after storage period of 13 weeks

①: dipping, control; ②: dipping, 20% sorbic acid; ③: dipping, 0.2% natamycin; ④: coating, control; ⑤: coating, 4% sorbic acid; ⑥: coating, 0.4% sorbic acid; ⑦: coating, 0.05% natamycin; ⑧: coating, 0.0125% natamycin

Table 4. Comparison of the Total Number of Fungi (Yeasts and Molds) of Surface Material detected in Gouda-type Cheese in the Presence of Natamycin and Sorbic Acid

Mode of addition	Concentration of natamycin and sorbic acid	Storage period (week) and location									
		1		2		4		8		13	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Dipping	0.2% Natamycin	3.4×10^5	1.5×10^5	3.3×10^8	1.3×10^5	9.3×10^8	2.1×10^6	3.6×10^8	4.5×10^7	6.9×10^9	7.1×10^8
	20% Sorbic acid	3.4×10^2	8.0×10^2	2.6×10^4	6.2×10^4	6.0×10^8	1.5×10^4	6.6×10^2	2.9×10^3	2.2×10^2	2.9×10^3
	Control* ¹	1.0×10^6	1.0×10^6	2.5×10^8	3.3×10^8	1.5×10^9	1.5×10^9	NT	NT	NT	NT
Coating	0.05% Natamycin	1.3×10^6	8.0×10^5	7.5×10^6	2.2×10^6	7.6×10^6	2.6×10^5	1.2×10^7	2.6×10^5	6.3×10^7	2.6×10^5
	0.0125% Natamycin	3.1×10^3	6.4×10^4	5.7×10^5	2.1×10^6	6.2×10^7	3.9×10^9	NT	NT	NT	NT
	4% Sorbic acid	2.8×10^4	2.0×10^2	2.3×10^4	8.2×10^4	2.9×10^4	3.5×10^4	3.4×10^6	2.3×10^5	1.3×10^8	3.5×10^5
	0.4% Sorbic acid	7.8×10^3	8.0×10^3	1.1×10^6	5.8×10^5	4.0×10^8	2.7×10^5	NT	NT	NT	NT
	Control* ²	9.0×10^5	9.0×10^5	5.2×10^7	4.8×10^8	5.1×10^8	4.5×10^8	NT	NT	NT	NT

Total number is shown as cfu per g.

NT: Not tested by reason of profusion.

*¹ Initial number of colonies: 6.4×10^5 cfu/g; *² Initial number of colonies: 3.8×10^4 cfu/g.

Table 5. Comparison of the Total Number of Mold Contaminants of Surface Material detected in Gouda-type Cheese in the Presence of Natamycin and Sorbic Acid

Mode of ad- dition	Concentration of natamycin and sorbic acid	Storage period (week) and location									
		1		2		4		8		13	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Dipping	0.2% Natamycin	-	-	1.9×10^7 *1	-	+	-	-	-	4.8×10^3 *1	2.0×10^6 *6
	20% Sorbic acid	-	-	-	-	-	+	+	-	1.1×10^2 *3	-
	Control	-	-	3.3×10^7 *1	-	2.9×10^8 *4	6.0×10^6 *1	NT	NT	NT	NT
Coating	0.05% Natamycin	-	-	-	-	-	-	+	-	1.1×10^2 *1	1.4×10^4 *7
	0.0125% Natamycin	-	-	-	-	7.5×10^6 *4	3.4×10^7 *1	NT	NT	NT	NT
	4% Sorbic acid	-	-	-	-	1.4×10^3 *1	2.0×10^3 *1	2.8×10^6 *2	-	1.2×10^3 *3	-
	0.4% Sorbic acid	-	-	-	-	7.5×10^7 *1	+	NT	NT	NT	NT
Control				1.0×10^5 *1	-	6.6×10^7 *5	6.0×10^6 *2	NT	NT	NT	NT

-: Not detected; +: Scarcely detected.

Dominant Penicillia: *1 = *P. viridicatum*; *2 = *P. roquefortii*; *3 = *P. viridicatum* + *P. roquefortii*; *4 = *P. viridicatum* + *P. crustosum*; *5 = *P. viridicatum* + *P. implicatum*; *6 = *P. viridicatum* + *P. verrucosum*; *7 = *P. roquefortii* + *P. brevicompactum*

Others: See footnote in Table 4.

最も増加が認められ、他の場合とは異なる推移を示した。

チーズの発酵工程でのチーズ表面における汚染カビの着生はチーズ表面の乾燥を招き、以後の熟成の妨げとなる。

ナタマイシン及びソルビン酸処理したチーズについて、各貯蔵期間ごとに1g当りのカビの生菌数を測定した結果をTable 5に示した。

上述の肉眼的観察による結果とはほぼ同様であった。すなわち対照では2週間後に一部試料にカビの汚染が認められ始め、4週間後には大量のカビ発生が計測された。一方ナタマイシン0.2%浸漬処理及びナタマイシン0.05%皮膜処理区では8週間目までその制御効果は発揮された。またソルビン酸処理の場合には20%浸漬処理区では13週間後までカビの発生はほとんど認められなかった。しかし4%皮膜処理の場合にはナタマイシン0.05%皮膜処理の場合よりも制御効果が劣り、4週間後からカビの発生が観察されるようになった。

貯蔵中に発生した主要カビを同定したところ、Table 5に示すように、*Penicillium viridicatum* が最も多く出現し、*P. roquefortii* がこれに次いだ。

4. チーズ処理及び貯蔵環境中の汚染カビ

熟成室内の空中浮遊菌はいずれも0.1 cfu/g程度の菌数で *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. roquefortii*), *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Lecythophora*, *Scytilidium* であり、落下菌は極めてわずかであるが、*Penicillium* 及び *Cladosporium* が検出された。

塗布室内の落下菌は熟成室での10倍程度で、20分間の暴露時間で15~32個のコロニーが出現した。主な菌種として *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. roquefortii*), *Alternaria*, *Botrytis* 及び *Cladosporium* が検出された。

また、浸漬液からは *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum*), *Acremonium*, *Alternaria*, *Botrytis* 及び *Cladosporium* が検出された。

考 察

これまでに、チーズの貯蔵中のナタマイシンの移行性及び品質に対する影響についてソルビン酸との比較報告^{6), 7)}がなされているが、これらの残留量と抗カビ効果について経時的に追求した報告はまだない。そこで両者の関連について考察した。

1. 貯蔵中のチーズの経時的状態変化

水分は実験開始時の値が34.78%であるのに対して、1週から3週までは30.54~33.83%とやや低い値を示している。その原因は保存料添加処理を行ったときの風乾時間をやや長くしたためと考えられる。なお、pH及び酸度にはほとんど変化は認められなかった。

2. ナタマイシン並びにソルビン酸の経時的残存性及び浸透性について

三分析機関で測定したところ、分析結果はナタマイシ

ン、ソルビン酸ともに良好な一致を示した。

Fig. 1に示したように当初表面の厚さ5mmの範囲に存在していたソルビン酸塩が時間の経過とともに内部に浸透し、5~10mm層に移行し、さらに中心部では4週間目から増加が認められるようになった。13週では未だ表面濃度が高く中心部が低いが、26週程度経過すると、平衡に達するものと考えられる。

一方ナタマイシンはいずれの処理、いずれの濃度においても表面に残存し、中心部では検出されなかった (Table 1)。さらに5~10mm層にも認められなかったこと (Fig. 1)より、表面にのみ残留し、浸透性が極めて小さいことが確認され、チーズリンドから中へ移行しないという Du Ruig ら⁸⁾の結果と一致した。

ナタマイシンの含量はFig. 1に示されるように2週間目に低下し、以後8週間目まで増加する現象がみられるが、ナタマイシンは塗布時初期の分散の状態から溶媒として用いた酢酸の蒸散により一時凝集し、ついで再びチーズ中の水分により徐々に拡散するとされている。凝集時には結晶化が進み、ナタマイシンのチーズ中の分散が不均質になり、抽出も不十分となる。また結晶化によってナタマイシン濃度の小さくなる部分が生じ、防かび効果が低下すると考えられる (Table 5)。このため欧米では7~10日目に再度塗布処理を行うが、その必要性が裏付けられた。

3. 貯蔵チーズにおける汚染かびの発生とナタマイシンの防かび効果

ナタマイシンによる貯蔵チーズのカビ制御は視覚評価、生菌数計測ともよく一致し、浸漬法では8週間後までソルビン酸塩20%処理とはほぼ同等の効果を示した。しかもソルビン酸塩処理に比較して、ナタマイシンによる微生物制御はカビに対して非常に選択性の強いものであり、チーズの熟成上重要な酵母を抑制するような悪影響は与えなかった。ただ、ナタマイシンは2週間後に一時的にカビ生菌数の増加が認められる試料もあったが、これについては前述のように再塗布によって防止できるものと思われる。すなわちナタマイシンはソルビン酸に比較して約1/100の濃度で有効であると結論することができる。一方、皮膜法ではナタマイシン0.05%処理がソルビン酸と比較し、4~8週間より勝る結果を示し、しかも両者の濃度比は8週目で1:80であった。

このように皮膜法は浸漬法に比較して低濃度で有効であり、優れた方法である。

また、Table 2の残存量から有効濃度は浸漬法ではソルビン酸として500 µg/g、ナタマイシン5 µg/g程度と考えられた。

このように初期使用濃度においても、また残存有効最小濃度においてもナタマイシンはソルビン酸の1/100濃度で有効であることが明らかにされた。また、皮膜法は浸漬法の1/5濃度で同等の効果を示した。

4. 貯蔵中に発生する主要カビ

2週間目以後に検出されたカビのフローラを構成する菌属は *Penicillium* であり、その同定結果から *P. viridicatum*, *P. roquefortii* の2種がいずれの場合も優先種であった。一方、これらの *Penicillium* はチーズ製造工程での環境調査から、熟成室、塗布室の常在菌として検出され、浸漬液からも分離されていることから、環境から由来し、チーズを汚染し、保存料の有効濃度が低下したときに増殖したものと思われる。

チーズ汚染菌として報告されているカビは *P. viridicatum*, *P. roquefortii* のほか、*P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. solitum*, *P. verrucosum* などが主要であると報告されている^{8)~12)}。またこれらの菌種中にはシトリニン、オクラトキシン、パツリン、ペニシリン酸、ペニトレム (penitrem) A, PR-トキシンなどの有毒二次代謝生産物 (マイコトキシン) を産生し、ナチュラルチーズ中に自然汚染を来す場合も報告されている^{13)~15)} ので、ナタマイシンなどの保存料の防かび効果が十分であれば、チーズの保存性を高めるとともにマイコトキシン汚染防止にも役立つものと考えられる。

要 約

1. 浸漬液法、皮膜塗布法ともナタマイシンはチーズ表面に残留し、これに対して、ソルビン酸は内部に浸漬することが明らかとなった。

2. ナタマイシンは約 5 µg/g (皮膜法) で保存効果があり、ソルビン酸に比べて約 1/100 濃度で有効である。

3. 皮膜法は浸漬法に比べて約 1/5 濃度で同等の効果を示した。

4. 皮膜法はナタマイシン添加が最も低濃度で有効で、5 µg/g で保存効果を示し、表面から厚さ約 5 mm を削り取ることでナタマイシン除去が可能である。

5. ナタマイシンの防かび効果は浸漬法、皮膜法とも処理後 8 週間目まで有効で、ソルビン酸塩と比較してカビに選択的な効果を示すことが特徴であった。一方、未処理の場合には 2 週間後に汚染かびが発生し、事後のチーズの熟成、貯蔵が妨げられた。

6. 検出された汚染かびは *Penicillium* が大部分であり、主要菌種は *P. viridicatum*, *P. roquefortii* と同定された。いずれもチーズに発生しやすい種であった。

文 献

- 1) Struyk, A. P., Hoette, I., Dorst, G., Waistvisz, J. M., Van Erk, T., Hoogerherde, J. C.: Antibiotics Annual, p. 878 (1957~1958).
- 2) Divekar, P. V., Bloomer, J. L., Eastham, J. F., Holtman, D. F., Shirley, D. A.: Antibiot. Chemother. **11**, 377~380 (1961).
- 3) Commission of the European Communities Directive General: Working Document on a Draft Proposal on the Approximation of the Laws of the Member States Concerning Food Additives Authorized For Use in Foodstuffs Intended for Human Consumption (1982).
- 4) 農林省振興局監修: "食品製造ハンドブック" p. 159~160 (1973) 地球出版。
- 5) 丸山 隆, 渡辺 緑, 戸花洋典, 松浦法夫, 浅居良輝: 食衛誌. **29**, 413~418 (1989).
- 6) De Ruig, W. G., van Oostrom, J. J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **70**, 944~948 (1987).
- 7) De Ruig, W. G., van den Berg, G.: Neth Milk Daily J. **39**, 165~172 (1985).
- 8) 宇田川俊一: 乳技協資料, **32**, 2~14 (1982).
- 9) Moubasher, A. H., Abdel-Kader, M. I. A., El-Kady, L. A.: Mycopathologia **66**, 187~190 (1978).
- 10) Northolt, M. D., van Egmond, H. P., Soentoro, P., Deijll, E.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **63**, 115~119 (1980).
- 11) Polonelli, L., Morace, G., Rosa, R., Castagnola, M., Frisvad, J. C.: Appl. Environ. Microbiol. **53**, 872~878 (1987).
- 12) Tsai, W.-Y. J., Liewen, M. B., Bullerman, L. B.: J. Food Protect. **51**, 457~462 (1988).
- 13) Bullerman, L. B., Olivigni, F. J.: J. Food Sci. **39**, 1,166~1,168 (1974).
- 14) Arnold, D. L., Scott, P. M., McGuire, P. F., Harwig, J., Nera, E. A.: Fd. Cosmet. Toxicol. **16**, 369~371 (1978).
- 15) Richard, L., Arp, L. H.: Mycopathologia **67**, 107~109 (1979).